



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของไขมันชั้นในการเป็นสารต้านการอักเสบ สารต้านการติดเชื้อ
ในหนูที่มีการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร
และสารต้านมะเร็งในหนูชนิดไมส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ

โดย รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดวงพร ทองงาม และคณะ

ธันวาคม 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของขมิ้นชันในการเป็นสารต้านการอักเสบ สารต้านการติดเชื้อ
ในหนูที่มีการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร
และสารต้านมะเร็งในหนูชนิดโมสต์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งระดับ

คณะผู้วิจัย

1. รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดวงพร ทองงาม
2. รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงนฤมล คล้ายแก้ว
4. อาจารย์ ดร.ธนัชฐา ฉัตรสุวรรณ
5. อาจารย์ ดร.โสธรา กนกพานนท์

สังกัด

- จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีของโครงการวิจัยนี้ ผู้ทำวิจัยหลักต้องขอขอบพระคุณคณะผู้ร่วมวิจัยทุกท่าน ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงนฤมล คล้ายแก้ว อาจารย์ ดร.ธนัฐรา ฉัตรสุวรรณ อาจารย์ ดร.โสธดา กนกพานนท์

ขอบพระคุณอดีตหัวหน้าภาควิชาสรีรวิทยา รองศาสตราจารย์นายแพทย์ประสงค์ ศิริวิริยะกุล นางสาวกวีญา สินธรา และเพื่อนร่วมงานท่านอื่นๆ ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังสำคัญที่ทำให้งานวิจัยนี้ลุล่วงตามวัตถุประสงค์

สุดท้ายต้องขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยนี้ จึงทำให้สามารถทำการวิจัยได้สำเร็จ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU4980032

ชื่อชุดโครงการ ผลของไขมันชั้นในการเป็นสารต้านการอักเสบ สารต้านการติดเชื้อในหนูที่มีการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร และสารต้านมะเร็งในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ

ชื่อนักวิจัย รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดวงพร ทองงาม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: d.thong@mailcity.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

เรื่องที่ 1

ผลของไขมันชั้นต่อการรื้อของโปรตีนในหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปาปี-ฟิโทสปีน และ การเปลี่ยนแปลงระดับวิตามินอีในหนูที่ติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร

การติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร เป็นสาเหตุของกระเพาะอาหารอักเสบ และการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เคอร์คูมินซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ของขมิ้นมีคุณสมบัติต่อต้านการอักเสบ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลจากการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลไร และผลในการต่อต้านการอักเสบของเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการรื้อของสารโมเลกุลใหญ่ออกจากหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปาปี-ฟิโทสปีนในเซลล์เยื่อกระเพาะอาหาร และการเปลี่ยนแปลงระดับวิตามินอีในซีรัมของหนู การทดลองใช้หนูเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมที่ให้เคอร์คูมิน กลุ่มติดเชื้อ กลุ่มติดเชื้อที่ได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมินขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และขนาด 600 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หลังติดเชื้อนาน 2 สัปดาห์ หนูในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมินจะถูกป้อนเคอร์คูมินขนาด 200 หรือ 600 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นใช้เทคนิค intravital fluorescence microscopy ศึกษาการรื้อของสารโมเลกุลใหญ่จากหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร ใช้วิธีทาง

immunohistochemistry ศึกษาการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้ในเซลล์เยื่อ
กระเพาะอาหาร และใช้เทคนิค ELISA ตรวจสอบระดับของวีอีจีเอฟในซีรัม

ผลการศึกษาพบความสำเร็จต่อการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีถึงร้อยละ 85 และการ
ติดเชื้อนำไปสู่การร่วของสารโมเลกุลใหญ่ การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้ และ
ระดับวีอีจีเอฟที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยค่าเฉลี่ยการร่วของสารโมเลกุล
ใหญ่คือร้อยละ 10.69 ± 1.43 และ 15.41 ± 2.83 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอ็น
เอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้คือร้อยละ 28.58 ± 2.82 และ 44.2 ± 5.24 และ ค่าเฉลี่ยระดับวีอีจีเอฟ
ในหน่วยพิโคกรัมต่อมิลลิตร คือ 228.57 ± 40.41 และ 619.43 ± 145.68 เมื่อเปรียบเทียบใน
กลุ่มควบคุม และกลุ่มติดเชื้อตามลำดับ กลุ่มควบคุมที่ได้เคอร์คูมินไม่มีผลต่อตัวแปรที่ศึกษาเมื่อ
เทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบว่าเคอร์คูมินทั้งสองความเข้มข้นมีผลลดการร่วของสารโมเลกุลใหญ่
และการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้ ($p \leq 0.05$) ค่าเฉลี่ยการร่วของสารโมเลกุล
ใหญ่คือร้อยละ 12.32 ± 2.13 และ 13.72 ± 2.22 และ ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ
เอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้คือร้อยละ 33.99 ± 4.83 และ 37.11 ± 4.34 ในกลุ่มติดเชื้อที่ได้รับ
การรักษาด้วยเคอร์คูมิน ขนาด 200 และ 600 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมตามลำดับ
ในขณะที่เคอร์คูมินไม่มีผลต่อการลดระดับวีอีจีเอฟ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อเฮลิโค
แบคเตอร์ไพโลรีเพิ่มการร่วของสารโมเลกุลใหญ่ออกจากหลอดเลือดของกระเพาะอาหาร การ
แสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้ และระดับวีอีจีเอฟ ถึงแม้ว่าเคอร์คูมินทั้งสองความ
เข้มข้นไม่สามารถลดระดับวีอีจีเอฟได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เคอร์คูมินสามารถลดการร่ว
ของสารโมเลกุลใหญ่และการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-พีทกลีบห้ได้ซึ่งแสดงว่าเคอร์คูมินมี
คุณสมบัติต่อต้านการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีในหนูทดลอง

เรื่องที่ 2

ผลของว่านหางจระเข้ ขมิ้นชัน กระเทียม และเปปแตสเซียมในการเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร

เฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรี เป็นสาเหตุของกระเพาะอาหารอักเสบ และแผลกระเพาะอาหาร สมุนไพรบางชนิดมีรายงานการเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประเมินผลของว่านหางจระเข้ ขมิ้นชัน กระเทียม และเปปแตสเซียมในการเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร ในหลอดทดลอง โดยทำการทดลองด้วยเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรสายพันธุ์มาตรฐาน NCTC 11637 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อนี้ จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยวิธี อาการไคลูชั่นที่ความเข้มข้น 0.016-512 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ ดิสก์ดิลฟิวชัน ความเข้มข้นของสมุนไพรที่ 20, 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัม ผลการทดลองพบค่าความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อของว่านหางจระเข้ >512, ขมิ้นชัน =64, กระเทียม >512, และเปปแตสเซียม >512 ตามลำดับ ไม่พบค่าอินฮิบิชั่นโซนในว่านหางจระเข้ กระเทียม และเปปแตสเซียม แต่ขมิ้นชันมีค่าอินฮิบิชั่นโซน 6.5-8 มิลลิเมตรเมื่อความเข้มข้นขมิ้นชันเป็น 200 และค่าอินฮิบิชั่นโซน 10-12 มิลลิเมตรเมื่อความเข้มข้นขมิ้นชันเป็น 400 ไมโครกรัม ตามลำดับ สรุปว่า ขมิ้นชันมีผลเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการศึกษาต่อไปทางคลินิก ไม่พบการเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรของว่านหางจระเข้ กระเทียม และเปปแตสเซียมในการทดลองนี้

เรื่องที่ 3

ผลของเจลาตินไฮโดรเจลที่ควบคุมการปล่อยสารเคอร์คูมินจากการเกิด หลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู

เพื่อศึกษาผลของเจลาตินไฮโดรเจลที่ควบคุมการปล่อยสารเคอร์คูมินจากการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู โดยแบ่งหนูทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 = กลุ่มควบคุม กลุ่ม 2 = Hep-G2 ทำการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู (2×10^6 เซลล์) ลงใน chamber และกลุ่ม 3 = Hep-G2-cur ทำการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู (2×10^6 เซลล์) ลงใน chamber และฝังเจลาตินไฮโดรเจล ที่บรรจุ curcumin 2-5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อครบกำหนด 14 วัน นำมาศึกษาผลการเกิดหลอดเลือดใหม่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ หลังการฉีด FITC-dextran-250 วิเคราะห์หาการเกิดหลอดเลือดใหม่โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Goba Lab II หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อบริเวณที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทูไปตัดทำการศึกษาโดยวิธี H&E เพื่อศึกษาขนาดของเซลล์มะเร็ง ผลการทดลองกลุ่ม Hep-G2 พบการเกิดหลอดเลือดใหม่ $68.69 \pm 0.9\%$ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม $32.18 \pm 3.37\%$ และเมื่อพบว่าในกลุ่ม Hep-G2-cur มีการเกิดหลอดเลือดใหม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $20.73 \pm 1.9\%$ ($p < 0.01$) ได้ และมีผลทำให้มะเร็งมีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่ม Hep-G2-cur สรุปเจลาตินไฮโดรเจลที่ควบคุมการปล่อยสารเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู 14 วันได้ และมีผลทำให้มะเร็งมีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำหลัก Curcumin, anti-inflammatory, anti-infection, anti-cancer

Abstract

Project Code: RMU4980032

Project Title: Curcumin is effective as the anti-inflammatory, anti-infection in *Helicobacter pylori* infected rats, and anti-cancer in Hepatoma cell implanted BALB/c-nude mice model

Investigator: Associated Professor Duangporn Thong-Ngam, MD.
Chulalongkorn University

E-mail Address: d.thong@mailcity.com

Project Period: 2 Years

เรื่องที่ 1

Effects of curcumin on gastric microvascular leakage, nf-~~KB~~ p65 expression, and change in vegf level in *helicobacter pylori* infected rats

Curcumin treatment did not affect baseline of these parameters. *H. pylori* infection was 85% successful rate and led to the macromolecular leakage as well as the activation of NF-~~KB~~ p65 and increase of VEGF level compared with control group. The averages percent of macromolecular leakage were $10.69\% \pm 1.43$ and $15.41\% \pm 2.83$, NF-~~KB~~ p65 immunoreactive cells were $28.58\% \pm 2.82$ and $44.2\% \pm 5.24$; and the averages concentration of VEGF level (pg/ml) were 228.57 ± 40.41 and 619.43 ± 145.68 in control and *H. pylori* infected group, respectively.

There were significant decrease of macromolecular leakage and NF-~~KB~~ p65 activated cells ($p \leq 0.05$) in curcumin 200 mg/kg and 600 mg/kg treated groups compared with *H. pylori* infected group. The average percents of macromolecular leakage were $12.32\% \pm 2.13$ and $13.72\% \pm 2.22$, and NF-~~KB~~ p65 immunoreactive cells were $33.99\% \pm 4.83$ and $37.11\% \pm 4.34$ in curcumin 200 mg/kg and 600 mg/kg treated

groups, respectively. Whereas, the effect of curcumin on VEGF level did not significantly decrease compared with *H. pylori* infected group.

Conclusion: *H. pylori* infection increased gastric microvascular leakage, NF-~~K~~B p65 expression, and serum VEGF level. Curcumin, an anti-inflammatory agent, at the dose of 200 and 600 mg/kg reduced the leakage and NF-~~K~~B p65 expression in *H. pylori*-infected rats.

เรื่องที่ 2

Antibacterial activity of *Aloe vera*, curcumin, garlic, and plau-noi against *Helicobacter pylori*.

Background: *Helicobacter pylori* is a bacterium implicated in the etiology of gastritis and peptic ulcers. Some herbal agents have been reported to have antibacterial activity against *H. pylori*. **Aim:** To assess the in vitro anti-*H. pylori* potential of four herbal substances including *Aloe vera*, curcumin, garlic, and plau-noi. **Methods and Materials:** A standard strain (NCTC 11637) and 9 clinical isolates of *H. pylori* were used to assess antibacterial activity of *Aloe vera*, curcumin, garlic, and plau-noi by using agar dilution and disk diffusion method. The agar dilution was tested by two-fold dilution of various concentration of herbal substances, ranging 0.016-512 micrograms/mL on Columbia blood agar. The disk diffusion was tested using various amounts of herbal substance at 20, 50, 100, 200 and 400 micrograms. **Results:** The minimum inhibitory concentrations (MICs) of *Aloe vera*, curcumin, garlic, and plaunotol were >512, 64, >512, >512 micrograms/mL, respectively. There were no inhibition zones found when testing with *Aloe vera*, garlic, and plau-noi, although the inhibition zone diameters of 6.5-8 mm and 10-12 mm were detected at 200 and 400 micrograms curcumin disk, respectively. **Conclusion:** Curcumin shows potential of in vitro antibacterial activity against *H. pylori* suggesting that it may be useful for the treatment of *H. pylori* infection, whereas, *Aloe vera*, garlic, and plau-noi have no antibacterial activity against *H. pylori* in this study.

Keywords: *Aloe vera*, curcumin, garlic, plau-noi, *H.pylori*

เรื่องที่ 3

Effects of Controlled Release Curcumin from Gelatin Hydrogel on Tumor-Angiogenesis Using Hep-G2 Implanted BALB/c-nude Mice Model

Introduction: This study was aimed to evaluate the benefit of novel curcumin gelatin-hydrogel patch on tumor anti-angiogenesis using the application of cholesterol-grafted gelatin-hydrogel technology. **Methods:** Animals were divided into three groups: control, hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice (Hep-G2, 30 μ l of 2×10^6 cells), and Hep-G2 treated with curcumin gelatin-hydrogel patch (Hep-G2-cur; curcumin 2-5 mg/ml per patch). Curcumin gelatin -hydrogel patch was placed within the chamber that was inoculated by Hep-G2 cells for two days. On day 14th after the Hep-G2 inoculation, tumor neocapillary was observed using intravital fluorescence videomicroscopy. Video images of epi-illuminated fluorescein (FITC-dextran-250) labeled tumor neocapillaries were obtained and evaluated for neocapillary density (CD) by using Global Lab Image II software. At the end of each experiment, tissue specimen was collected from tumor area for further hematoxylin-eosin (H&E) examination.

Results: In Hep-G2, CD ($68.69 \pm 0.9\%$) was significantly increased as compared to controlled CD ($32.18 \pm 3.37\%$). Interestingly, the CD value of Hep-G2-cur ($20.73 \pm 1.9\%$) was significantly less than the Hep-G2-CD ($p < 0.01$). In addition, H&E demonstrated that Hep-G2-cur tumor area was significantly less than Hep-G2-area as well.

Conclusion: Our results showed that the novel controlled release curcumin-gelatin hydrogel patch could attenuate tumor angiogenesis and consequently tumor growth.

บทนำ ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Curcuma longa (Linn.) เป็นชื่อทางวิทยาศาสตร์ของ tumeric หรือที่คนไทยเรียกว่าขมิ้นชัน ซึ่งเป็นพืชในตระกูลขิงข่า (Zingiberaceae) curcumin หรือ diferuloylmethane เป็นส่วนที่ถูกสกัดจากรากของขมิ้นชันมีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบและเป็นยาฆ่าเชื้อ (67) นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่แสดงถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดมะเร็งและการกระจายของเซลล์มะเร็งในกระเพาะอาหารของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็ง (68)

คุณสมบัติในการต้านการอักเสบของ curcumin มาจากหลักฐานที่สนับสนุนว่า curcumin ยับยั้งการเกิดการกระตุ้นของ transcription factor สองตัวหลักคือ NF- κ B และ AP-1 (69-71) โดย curcumin สามารถยับยั้งการทำงานของ IKK complex และการเสื่อมสภาพของ I κ B หน่วยย่อย α รวมถึงการเคลื่อนย้าย NF- κ B-p65 ด้วย (72, 73) ทำให้การผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบลดลงซึ่งรวมถึง VEGF มีรายงานที่แสดงว่า curcumin สามารถลดการสร้าง mRNA ของยีน VEGF ใน Ehrlich ascites tumor cells และ NIH 3T3 cells ทั้งยังยับยั้ง tyrosine kinase Flk-1/KDR (VEGF receptor-2) ใน HUVEC cells (74)

การทดลองในปี 2002 (9) พบว่า curcumin สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *H. pylori* ในขณะที่ Foryst-Ludwig และผู้ร่วมงาน (72) ทำการทดลอง in vitro ของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารที่มีเชื้อ *H. pylori* พบว่า curcumin ไม่มีผลต่อปริมาณของเชื้อในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงและไม่เป็นพิษต่อเซลล์แต่ curcumin สามารถยับยั้งการทำงานของ NF- κ B รวมถึงการผลิต IL-8 และยับยั้งการกระจายตัวของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงอันเป็นผลจากการเหนี่ยวนำของเชื้อ *H. pylori*

H. pylori เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เจริญเติบโตภายใต้ภาวะที่ใช้ออกซิเจนน้อย การติดเชื้อ *H. pylori* สัมพันธ์กับการเกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบ และโรคต่างๆ ในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคแผลในทางเดินอาหารส่วนต้น (peptic ulcer) (2) นอกจากนี้หากไม่รักษาจะมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในกระเพาะอาหาร (3) *H. pylori* ถูกจัดเป็นปัจจัยก่อมะเร็งประเภทที่ 1 (type I carcinogen) โดยองค์การอนามัยโลกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1994 จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าในประเทศที่กำลังพัฒนามีความชุกของการติดเชื้อ *H. pylori* โดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 13 ถึงร้อยละ 70 และร้อยละ 70 ถึงร้อยละ 94 ในกลุ่มประชากรที่มีอายุ 0 ถึง 20 ปีและอายุ 30 ปีขึ้นไปตามลำดับ (4) การติดเชื้อนี้มักได้รับเชื้อในวัยเด็กซึ่งแบคทีเรียจะถูกถ่ายทอดระหว่างสมาชิกในครอบครัวทางอุจจาระหรืออาเจียนเข้าสู่ปาก (5)

อย่างไรก็ตามปัจจุบันนี้พบสายพันธุ์ที่ดื้อยาของเชื้อ *H. pylori* ต่อกลุ่มยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับการรักษา (6) จึงมีการคิดค้นการรักษาแนวใหม่ด้วยการใช้สมุนไพรเพื่อฆ่าหรือยับยั้งการ

เจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* หรือใช้สมุนไพรเพื่อลดการอักเสบที่เกิดจากเชื้อ *H. pylori* ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้

การติดเชื้อ *H. pylori* เป็นสาเหตุของกระเพาะอาหารอักเสบอย่างต่อเนื่องและสัมพันธ์กับการเกิดโรคโดยเริ่มต้นหลังจากการเกาะติดของเชื้อ pathogen สามารถจับกับโมเลกุลของ class II major-histocompatibility-complex (MHC) บนพื้นผิวของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารและเกิดการชักนำกระบวนการตายของเซลล์นั้น (24) การอักเสบในระยะแรกนั้นมีการสร้างและหลั่ง interleukin (IL) -8 และ chemokines ตัวอื่นโดยเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร (25) การหลั่ง IL-8 นั้นมีบทบาทสำคัญที่สามารถกระตุ้นและดึงดูด neutrophils ให้เข้ามารวมตัวกันในชั้น mucosa ของกระเพาะอาหาร (26) *H. pylori* ที่มีกลุ่มยีน *cag*-PAI สามารถชักนำการสร้าง IL-8 ซึ่งขึ้นอยู่กับการทำงานของ NF- κ B และ transcription factor activator protein-1 (AP-1) ได้มากกว่าสายพันธุ์ที่ไม่มีกลุ่มยีนนี้ (27, 28) เนื่องจากโปรตีนที่สร้างจากกลุ่มยีน *cag*-PAI สามารถกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ได้โดยตรง (29)

ยังไม่มีงานวิจัยที่ใช้ curcumin ในการต้านการติดเชื้อ ด้านการอักเสบในกระเพาะอาหารซึ่งเกิดจากเชื้อ *H. pylori* ด้วยเหตุนี้จึงกล่าวว่าการทดลองนี้จึงทำการศึกษาผลของ curcumin ต่อการเปลี่ยนแปลง permeability (การเคลื่อนที่ของของเหลวและโมเลกุลระหว่างหลอดเลือดและส่วนประกอบนอกหลอดเลือด) ของระบบไหลเวียนเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร การแสดงออกของ nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 และการเปลี่ยนแปลงระดับ vascular endothelial growth factor (VEGF) ในซีรัมของหนูที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ดังกล่าวที่เพิ่มขึ้นเป็นตัวบ่งบอกการเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ และเพื่อศึกษาผลของการควบคุมการปล่อยสาร curcumin โดยใช้เจลาคินไฮโดรเจล ต่อการยับยั้งการหลอดเลือดใหม่ ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ

วัตถุประสงค์และผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อศึกษาผลด้านการอักเสบของ curcumin ในการผลลการรั่วของหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร การแสดงออกของ NF- κ B p65 และระดับของ VEGF ในซีรัมของหนูที่เป็นกระเพาะอาหารอักเสบจากการติดเชื้อ *H. pylori*
2. เพื่อศึกษาผลด้านการติดเชื้อของ curcumin ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ในหลอดทดลอง
3. เพื่อศึกษาผลด้านมะเร็งของ curcumin โดยใช้เจลาคินไฮโดรเจลเพื่อควบคุมการปล่อยสาร ต่อการยับยั้งการหลอดเลือดใหม่ ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ

แนวทางในการนำผลการวิจัยสู่การพัฒนาและการใช้ประโยชน์

มีการนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการทั้งในประเทศและต่างประเทศ

ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 3 เรื่อง

วิธีดำเนินการวิจัย แผนการดำเนินการและกิจกรรมวิจัย

เรื่องที่ 1 ศึกษาผลด้านการอักเสบของ curcumin ในการผลลการรั่วของหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร การแสดงออกของ NF- κ B p65 และระดับของ VEGF ในซีรัมของหนูที่เป็นกระเพาะอาหารอักเสบจากการติดเชื้อ *H. pylori*

วิธีการทดลอง

1) การติดเชื้อ *H. pylori*

วันที่เริ่มทำการทดลองอดอาหารหนู 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้ยา Streptomycin เพื่อฆ่าเชื้อในทางเดินอาหารของสัตว์ทดลองก่อนทำการติดเชื้อ *H. pylori* โดยละลายยาในน้ำประปาให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำใส่ขวดให้น้ำเพื่อให้สัตว์ดื่มเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน หลังจากนั้นนำเชื้อ *H. pylori* ที่อยู่ใน sterile normal saline ความเข้มข้น 5×10^5 ถึง 5×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ป้อนให้หนูทาง orogastric tube วันละ 2 ครั้ง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร เว้นช่วงห่างครั้งละ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน และอดอาหารระหว่างที่ทำการติดเชื้อ (77, 78)

2) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดบริเวณกระเพาะอาหารโดยใช้ระบบกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscopy and image analysis) เพื่อศึกษาการรั่วของ albumin ออกจากหลอดเลือดดำฝอย

สัตว์ทดลองถูกทำให้สลบด้วยการฉีดโซเดียมเพนโทบาบิทอล ขนาด 45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของหนู ทางช่องท้อง จากนั้นทำ tracheotomy และสอดท่อ (cannulate) polyethylene (PE 10, เส้นผ่านศูนย์กลางด้านในของท่อมีขนาด 0.2 มิลลิเมตร) ซึ่งหล่อด้วย heparin เข้าทาง jugular vein แล้วเปิดช่องท้องขนาดแผลยาว 1 เซนติเมตร ดึงกระเพาะอาหารออกนอกลำตัวแล้ววางแผ่นแทนที่ด้วยสำลี ใช้ด้ายตรึงกระเพาะไว้ รักษาสภาพให้คล้ายคลึงกับในลำตัวด้วยการหยด Krebs's solution ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนกระเพาะอาหารสม่ำเสมอตลอดการทดลอง จากนั้นนำหนูวางบนแท่นของกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Nikon model Optiphot-2) และฉีด FITC-250 ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (5 มิลลิกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร normal saline) เข้าทาง jugular vein (79) เพื่อใช้ติดตาม albumin ที่อยู่ในพลาสมา หลังจากนั้น 5 นาทีบันทึกวิดีโอเทประหว่างทำการทดลองเพื่อศึกษาการรั่วของ albumin ออกนอกเยื่อผนังหลอดเลือด

เลือดของหลอดเลือดดำฝอย แล้วใช้ Global Lab image analysis เพื่อทำการวัดความเข้มของแสงที่อยู่ภายนอก (Intensity outside, I out) และภายใน (Intensity inside, I in) หลอดเลือดดำฝอย แล้วคำนวณเป็นสัดส่วนของ I out/I in ที่ช่วงเวลา 0, 5, 15, 30 และ 45 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำมาเทียบเป็นความเข้มแสงที่เปลี่ยนไป ณ เวลาต่างๆ จากเวลาเริ่มต้นด้วยสมการ

$$\text{Intensity ratio} = I \text{ out}/I \text{ in ที่เวลาต่างๆ (5, 15, 30, 45)} - I \text{ out}/I \text{ in ที่เวลาเริ่มต้น (0)} \quad (76)$$

3) การตรวจหาการแสดงออกของ NF- κ B p65 โดยวิธี immunohistochemistry

นำ section ของกระเพาะอาหารมาบ่มด้วย anti-p65 antibody ซึ่งเป็น primary antibody ตามด้วย secondary antibody ที่ต่อกับ biotin อยู่ หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาดัวย avidin-biotin-horseradish peroxidase โดยมี diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นสารตั้งต้น เซลล์ที่ NF- κ B ถูกกระตุ้นจะติดสีน้ำตาลดำที่นิวเคลียส

4) การตรวจหาระดับ VEGF โดยวิธี ELISA

เก็บเลือดจากท่อที่ต่อกับหลอดเลือด artery ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 1000g เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนของเซรุ่มเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์โดยใช้ Rat VEGF Immunoassay kit (Quantikine) หลังจากนั้นอ่านค่าด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

5) การตรวจสอบการติดเชื้อ *H. pylori*

หลังจากทำการศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ เรียบร้อยแล้วหนูทุกกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *H. pylori* ถูกตรวจสอบเพื่อยืนยันผลการติดเชื้อ *H. pylori* ในกระเพาะอาหารซึ่งต้องได้ผลว่ามีการติดเชื้อทุกการทดสอบ โดยมีวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้

Enzymatic test โดยทำ Urease test

หลังจากเก็บตัวอย่างเลือดแล้วทำการ Sacrifice หนูโดยใช้ Sodium pentobarbital เกินขนาด จากนั้นนำกระเพาะอาหารออกมาแล้วเปิดกระเพาะอาหารด้าน greater curvature ใช้ normal saline ล้างเศษอาหารออกแล้วตัดส่วน mucosa ของกระเพาะอาหารส่วน antrum ขนาดประมาณ 1 ตารางมิลลิเมตร ใส่หลอด urease test ที่มียูเรียและตัวชี้ระดับ pH (pH indicator) ในกรณีที่มีการติดเชื้อจะมีเอนไซม์ urease จากแบคทีเรียสร้างแอมโมเนียจากยูเรีย ส่งผลให้ pH เพิ่มขึ้นและทำให้สีในหลอดเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพูภายใน 24 ชั่วโมง



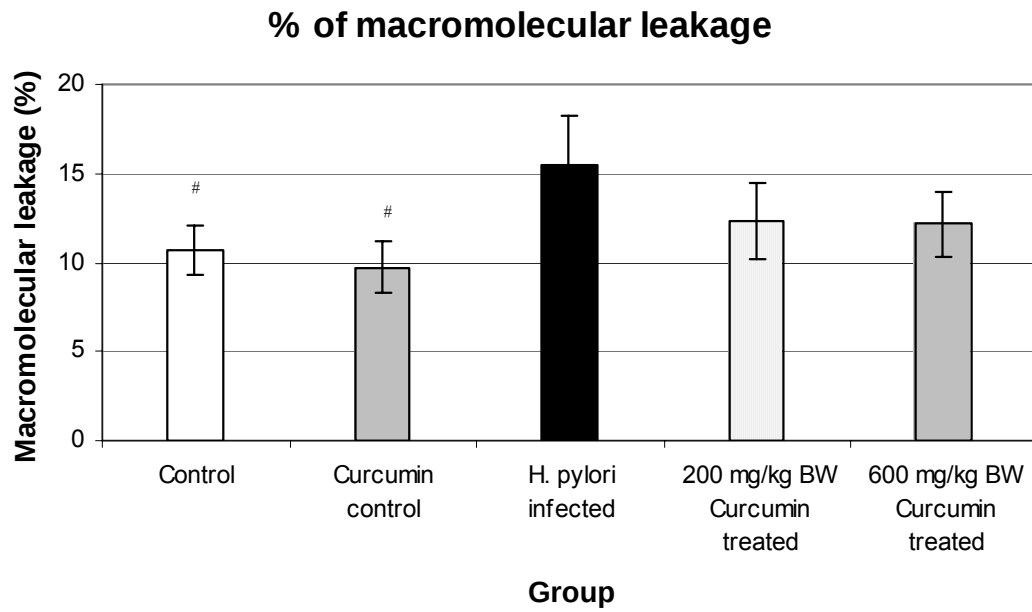
Histopathology

หลังจากเก็บ mucosa เพื่อทดสอบ urease test เรียบร้อยแล้วนำกระเพาะอาหารใส่ใน buffer formalin หลังจากตัด section ของกระเพาะอาหารแล้วนำมาย้อมด้วย hematoxylin และ

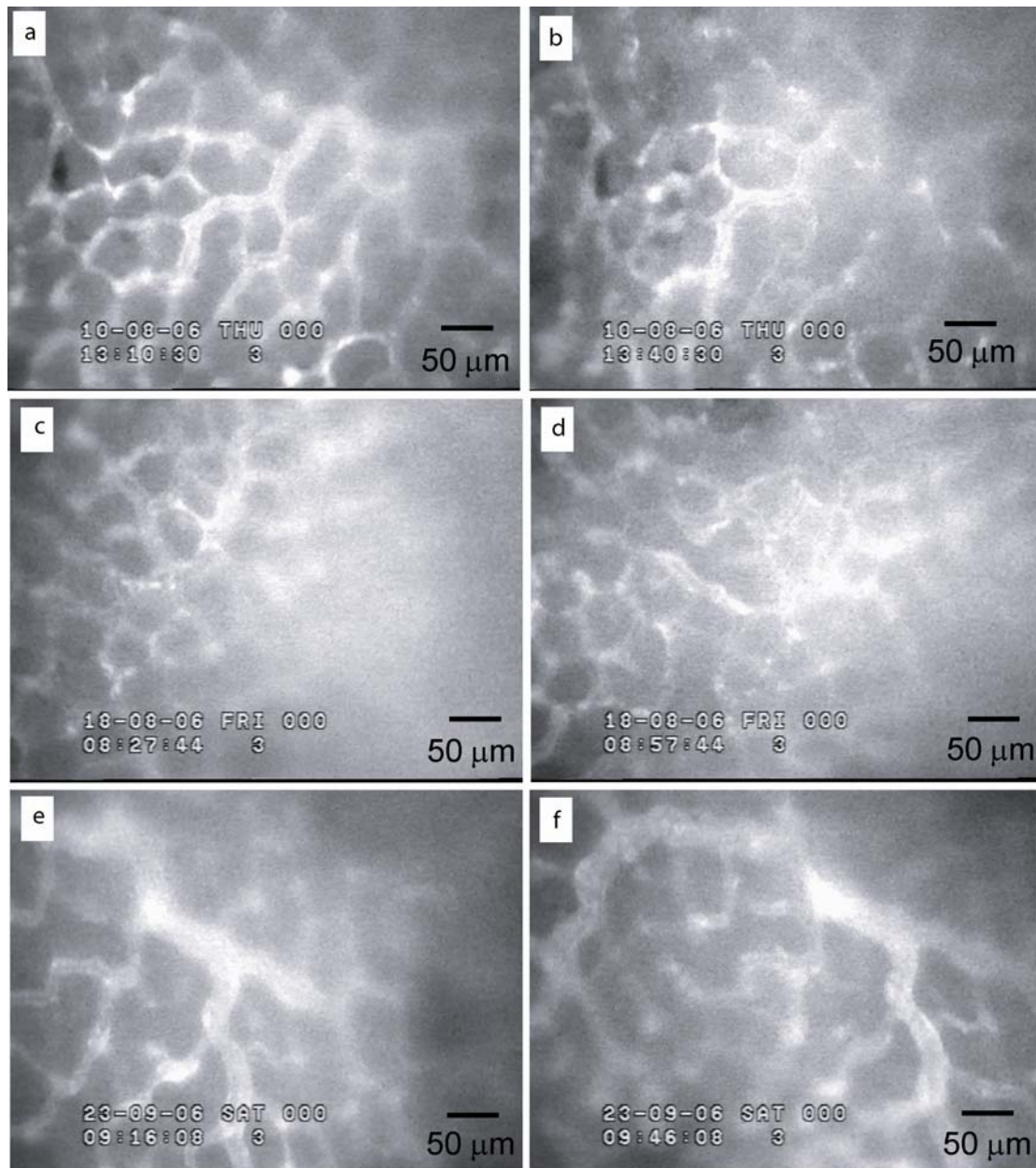
eosin และนำตัวอย่าง section ของกระเพาะอาหารที่ย้อมแล้วไปตรวจหาการเปลี่ยนแปลงทาง histopathology ว่ามีการอักเสบของกระเพาะอาหารมากน้อยเพียงใดและในกรณีที่มีการติดเชื้อจะเห็นตัวเชื้อ *H. pylori* รูปร่างเกลียวคดสีม่วงอยู่บนเยื่อเมือกกระเพาะอาหาร

ผลการวิจัย

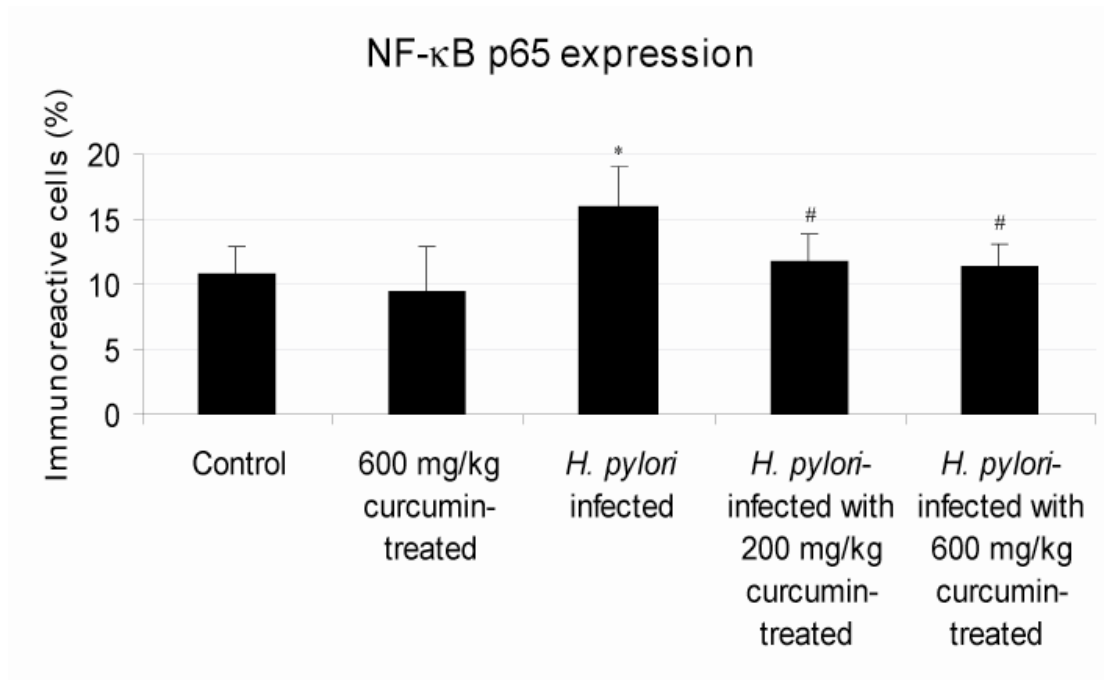
ผลการศึกษาพบความสำเร็จต่อการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีถึงร้อยละ 85 และการติดเชื้อนำไปสู่การร่วของสารโมเลกุลใหญ่ การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟีนกลิบห้า และระดับวีอีจีเอฟที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยค่าเฉลี่ยการร่วของสารโมเลกุลใหญ่คือร้อยละ 10.69 ± 1.43 และ 15.41 ± 2.83 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟีนกลิบห้าคือร้อยละ 28.58 ± 2.82 และ 44.2 ± 5.24 และ ค่าเฉลี่ยระดับวีอีจีเอฟในหน่วยฟิโคกรัมต่อมิลลิกรัม คือ 228.57 ± 40.41 และ 619.43 ± 145.68 เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม และกลุ่มติดเชื้อตามลำดับ กลุ่มควบคุมที่ได้เคอร์คูมินไม่มีผลต่อตัวแปรที่ศึกษาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบว่าเคอร์คูมินทั้งสองความเข้มข้นมีผลลดการร่วของสารโมเลกุลใหญ่ และการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟีนกลิบห้า ($p \leq 0.05$) ค่าเฉลี่ยการร่วของสารโมเลกุลใหญ่คือร้อยละ 12.32 ± 2.13 และ 13.72 ± 2.22 และ ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟีนกลิบห้าคือร้อยละ 33.99 ± 4.83 และ 37.11 ± 4.34 ในกลุ่มติดเชื้อที่ได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมิน ขนาด 200 และ 600 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมตามลำดับ ในขณะที่เคอร์คูมินไม่มีผลต่อการลดระดับวีอีจีเอฟ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีเพิ่มการร่วของสารโมเลกุลใหญ่ออกจากหลอดเลือดของกระเพาะอาหาร การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟีนกลิบห้า และระดับวีอีจีเอฟ ถึงแม้ว่าเคอร์คูมินทั้งสองความเข้มข้นไม่สามารถลดระดับวีอีจีเอฟได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เคอร์คูมินสามารถลดการร่วของสารโมเลกุลใหญ่และการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟีนกลิบห้าได้ซึ่งแสดงว่าเคอร์คูมินมีคุณสมบัติต่อต้านการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีในหนูทดลอง



รูปที่ 1 A bar graph shows the mean $\pm$ SD of macromolecular leakage (%) of all experimental groups. Each group is represented by the mean of 5 rats. The sign $\star$ is represented significant difference compared with control group ($p < 0.05$), and the sign $\#$ is represented significant difference compared with *H. pylori* infected group ($p < 0.05$).



รูปที่ 2 Intravital fluorescent microscopic images (200X) demonstrated macromolecular leakage from vessels to the interstitial fluid (increased intensity of fluorescence) by the time (0 and 30 minute) of control group (a and b), *H. pylori*-infected group (c and d), and *H. pylori*-infected with 200 mg/kg curcumin-treated group (e and f). After FITC-dx-250 injection, the microvessels were visible (a, c, and e). At 30 minute after FITC-dx-250 injection, at the same area, the labelled macromolecules leaked into the interstitial space (b, d, and f).



รูปที่ 3 A bar graph showed the mean $\pm$ SD of NF- κ B p65 expression (%) of experimental groups. The sign * represented significant difference compared with control group ($p < 0.05$). The sign # represented significant difference compared with *H. pylori*-infected group ($p < 0.05$).

เรื่องที่ 2 ศึกษาผลด้านการติดเชื้อของ curcumin ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ในหลอดทดลอง

นำเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากการเพาะเชื้อจากผู้ป่วยที่มีกระเพาะอาหารอักเสบหรือเป็นแผลในกระเพาะอาหาร จำนวน 36 strains

วิธีการศึกษา

1. Bacteria Strains : เชื้อ *H. pylori* ที่แยกได้จากชิ้นเนื้อ gastric biopsy ของผู้ป่วย ซึ่งเก็บไว้ใน stock culture นำมา subculture บน Columbia agar ที่ผสมเลือดแกะและ horse serum หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะ microaerophilic เป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน ทำหลายครั้งจนได้เชื้อปริมาณมากพอ
2. นำเชื้อมาทดสอบความไวรับของเชื้อ *H. pylori* ต่อขมิ้นชันโดยนำมาทดสอบโดยวิธี Disc diffusion และตรวจหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) โดยวิธี Agar dilution

2.1 Disc diffusion

2.1.1 เลือก pure colony ของเชื้อที่ได้จากการ subculture เชื้อลงใน brain heart infusion broth ปรับความขุ่นให้ได้ 3 McFarland (ประมาณ 9×10^8 cells/ml)

2.1.2 ใส่ suspension ของเชื้อใน Columbia blood agar แล้วใช้ spreader กระจาย suspension ของเชื้อให้สม่ำเสมอ หลังจากนั้นให้ดูด suspension ส่วนเกินทิ้งไป เมื่อ plate แห้ง จึงวาง disc ที่มีความเข้มข้นของขมิ้นชันต่างกัน ได้แก่ 125 µg, 250µg, 500µg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 8 mg นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะ microaerophilic เป็นเวลานาน 3 วัน

2.1.3 อ่านผลโดยวัด inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบๆ disc

2.2 วิธี Agar dilution

2.2.1 เลือก pure colony ของเชื้อที่ได้จากการ subculture เชื้อลงใน brain heart infusion broth ปรับความขุ่นให้ได้ 3 McFarland (ประมาณ 9×10^8 cells/ml)

2.2.2 นำขมิ้นชันที่ใช้ทดสอบมาเจือจางแบบ two-fold dilution โดยมีความเข้มข้นของยาตั้งแต่ 0.016-512 mg/L ใน Columbia blood agar

2.2.3 นำเชื้อที่เตรียมไว้ spot บน Columbia blood agar ที่มีความเข้มข้นของขมิ้นชันต่างๆกัน และ บน Columbia blood agar ที่ไม่มีขมิ้นชัน ตามลำดับ โดยใช้ 3 µl/spot นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะ microaerophilic เป็นเวลานาน 3 วัน

จึงอ่านผล MIC (Minimum Inhibitory Concentration) คือ ค่าความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ

ผลการวิจัย

ผลการทดลอง พบค่าความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อของว่านหางจระเข้ >512, ขมิ้นชัน =64, กระเทียม >512, และเปล้าน้อย >512 ตามลำดับ ไม่พบค่าอินฮิบิชั่นโซนในว่านหางจระเข้ กระเทียม และเปล้าน้อย แต่ขมิ้นชันมีค่าอินฮิบิชั่นโซน 6.5-8 มิลลิเมตรเมื่อความเข้มข้นขมิ้นชันเป็น 200 และค่าอินฮิบิชั่นโซน 10-12 มิลลิเมตรเมื่อความเข้มข้นขมิ้นชันเป็น 400 ไมโครกรัม ตามลำดับ สรุปว่า ขมิ้นชันมีผลเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการศึกษาต่อไปทางคลินิก ไม่พบการเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรของว่านหางจระเข้ กระเทียม และเปล้าน้อยในการทดลองนี้

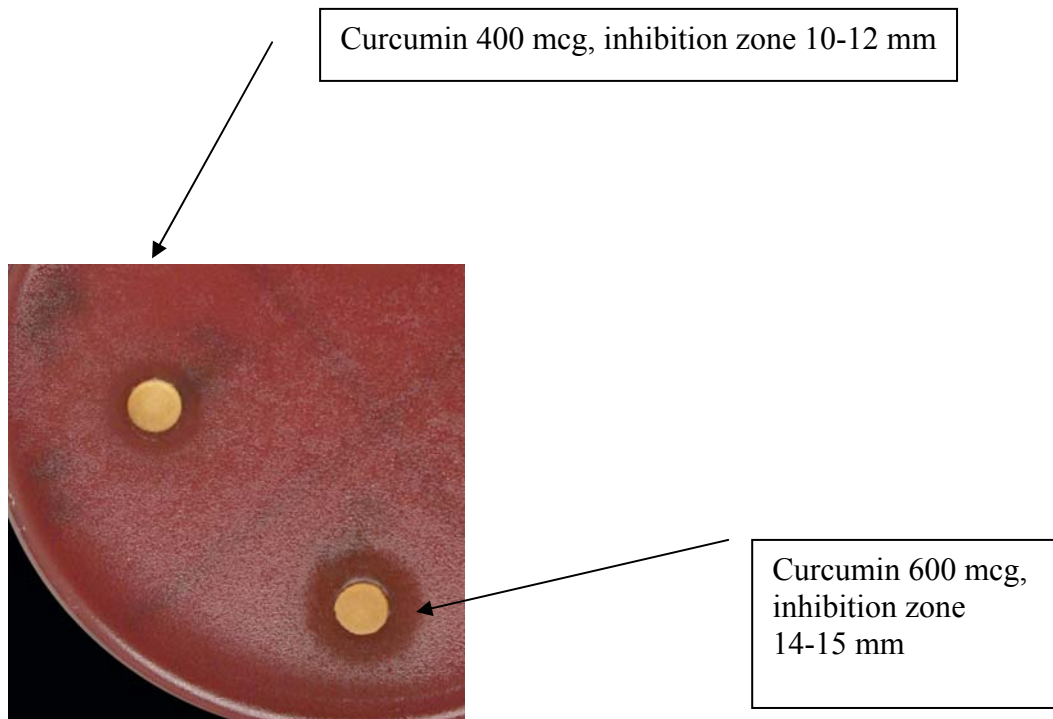
ตารางที่ 1 The results of agar dilution method

agar dilution	minimum inhibitory concentrations (MICs) micrograms/mL
<i>Aloe vera</i>	>512
Curcumin	64
Garlic	>512
Plau-noi	>512

ตารางที่ 2 The results of disk diffusion method

disk	Inhibition zone diameter (mm.)				
diffusion	20	50	100	200	400
<i>Aloe vera</i>	0	0	0	0	0
Curcumin	0	0	0	6.5-8	10-12
Garlic	0	0	0	0	0
Plau-noi	0	0	0	0	0

รูปที่ 1 Show the inhibition zone of curcumin disk



เรื่องที่ 3 ศึกษาผลต้านมะเร็งของ curcumin โดยใช้เจลตินไฮโดรเจลเพื่อควบคุมการปล่อยสาร ต่อการยับยั้งการหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดไมส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ

การเตรียม gelatin hydrogel

เมื่อได้สารละลาย cholesterol grafted gelatin (3% wt/wt) มาหล่อแบบด้วย Teflon molds แล้วทิ้งให้เย็นที่ -30°C แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยา Crosslink กับ glutaraldehyde in acetone:water (75:25) mixture for 24 hours at 4°C [2-3]. สาร glutaraldehyde ที่มากเกินไปจะถูกกำจัดออกโดย 0.1M glycine solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และ สาร glutaraldehyde ที่มากเกินไปจะถูกล้างออกโดย de-mineralized water ได้เป็นสิ่งที่ต้องนำไป freeze dried เป็นเวลา 2-3 วันแล้วเก็บในที่แห้ง

การใส่เคอร์คูมินลงใน cholesterol-grafted gelatin hydrogel

ไฮโดรเจลที่แห้งแล้ว (Dried cholesterol-grafted gelatin hydrogels) จะถูกนำมาตัดเป็นแผ่นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตรหนา 0.8 มิลลิเมตรและ steriled โดยใช้ ethylene oxide chamber หรือ 70% ethanol หลังจากนั้นจึงนำไปแช่ในสารละลายเคอร์คูมิน (2-5 mg/ml, 50% ethanol solution) เป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่ 37°C แล้วจึงทำให้แห้ง

ในการทดลองครั้งนี้ใช้หนูชนิดไมส์ (BALB/c-nude mice, National Animal Center at Salaya, Mahidol University, Thailand) อายุประมาณ 6 สัปดาห์ (BW. 20-30 g) จำนวน 36 ตัว แบ่งเป็น :

1. หนูกลุ่มควบคุม (control, $n=12$) เป็นหนูกลุ่มที่ได้รับการใส่ dorsal skin-fold chamber ที่หลังและหยอดด้วย normal saline
2. หนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกเซลล์มะเร็งชนิด Hepatoma carcinoma cell (American Culture, supplied by The Government Pharmaceutical Organization, Bangkok, Thailand) (Hep G2 –mice; $n=12$), โดยใช้ Hep G2 cells จำนวน 2×10^6 cells หยอดลงใน dorsal skin-fold chamber ดังรูปที่ 1
3. หนูกลุ่มที่ได้รับการปลูกเซลล์มะเร็ง และได้รับ curcumin-loaded gelatin hydrogel (Hep G2 – Cur; $n=12$, 300 micrograms per mouse) ที่จะทำการฝังลงใน chamber 2 วันหลังจากที่

เซลล์มะเร็งปลูกติดและแข็งดีแล้ว

เมื่อหนูครบ 7 (n=6) และ 14 (n=6)

วันจะถูกนำมาทำการศึกษาปริมาณ

ของหลอดเลือดใหม่ โดยวิธี

Intravital fluorescence

Videomicroscopy

ภาพของหลอดเลือดที่อยู่ใน dorsal



รูปที่ 1



รูปที่ 2

Curcumin-loaded hydrogel

skin-fold chamber ของหนูแต่ละกลุ่ม

จะทำการวิเคราะห์โดย โปรแกรม วิเคราะห์ภาพ (Image software called Global Lab II)

หลังจากเสร็จสิ้นการทดลอง ตัวอย่างเลือดจะถูกเก็บเพื่อนำไปวิเคราะห์หา serum vascular endothelial growth factor (VEGF) โดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA)

Determination of Neocapillary density (NCD)

ปริมาณของหลอดเลือดใหม่จะสามารถคำนวณโดยใช้สมการ : [1].

$$NCD = \frac{\text{total number of pixels within the capillaries}}{\text{Total number of pixels within the window area}} \times 100 \%$$

Total number of pixels within the window area

การเตรียมสัตว์ทดลอง (Animal preparation)

การทดลองนี้ใช้หนูชนิด BALB/c-nude mice อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนักตัวระหว่าง 22-25 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองสาธิต หนูชนิดนี้ทุกตัวได้รับอาหาร และน้ำดื่มปกติ อาศัยเลี้ยงในห้องปลอดเชื้อที่มีสิ่งแวดล้อมเดียวกัน ให้มีแสงสว่างและมืดในระยะเวลาเท่ากัน คือ 12 ชั่วโมง ก่อนการทดลองแต่ละครั้งหนูชนิดนี้จะได้รับอาหารอย่างน้อย 6 ชั่วโมง แต่ได้รับน้ำดื่มตามปกติ

การเตรียมสัตว์ทดลองในการศึกษาผลของเจลาคตินไฮโดรเจลที่ควบคุมการปล่อยสารเคอร์คูมิน ในการป้องกันการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดนี้ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจีทู

หลังจากเตรียมสัตว์ทดลองตามวิธีดังกล่าวข้างต้นแล้ว สัตว์ทดลองจะได้รับยาสลบ คือ Sodium pentobarbital ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal; i.p) ปริมาณ 15 มิลลิกรัม / กิโลกรัม น้ำหนักตัว เมื่อสัตว์ทดลองสลบทำความสะอาดบริเวณผิวหนังด้านหลังของหนูชนิดนี้ด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วทำการตัดผิวหนังด้านหลังเป็นวงกลมให้มีขนาดเท่ากับ chamber

ประกบตัว chamber เข้ากับผิวหนังส่วนนี้โดยการเย็บส่วนผิวหนังให้ติดกับ chamber แล้วทำการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู (2×10^6 เซลล์) ลงใน chamber เรียกกลุ่มนี้ว่า HepG2- mice ขั้นตอนเหล่านี้ทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

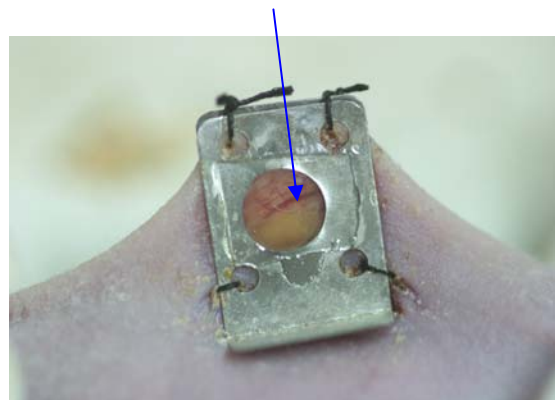
สำหรับหนูทดลองที่ใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ มีขั้นตอนการติด chamber เช่นเดียวกับกลุ่ม Hep-G2 mice แต่ไม่ถูกปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู เรียกกลุ่มนี้ว่ากลุ่มควบคุม (Control) 2 วัน หลังจากการติด chamber หนูทดลองทั้งสองกลุ่มจะถูกฝังเงลาตินไฮโดรเจล โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. หนูทดลองที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู ได้รับการฝังเงลาตินไฮโดรเจลที่บรรจุ PBS (HepG2, n=6) เช่นเดียวกับหนูกลุ่มควบคุม (Control, n=6)
2. หนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู ได้รับการฝังเงลาตินไฮโดรเจลที่บรรจุ curcumin (HepG2-cur- patch, n=6)

บริเวณที่วางแผ่นเคอร์คูมินไฮโดรเจล



รูปที่ 1.a. ในวันที่ 2 นำหนูควบคุมมาใส่ PBS แพตช์ [control]
cur-patch]



รูปที่ 1.b. ในวันที่ 2 นำหนูมาใส่เคอร์คูมินแพตช์ [HepG2-cur-patch]

เมื่อครบกำหนดคือ 7 และ 14 วัน จึงนำมาศึกษาผลของ เงลาตินไฮโดรเจลที่บรรจุ curcumin ต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ซึ่งจะได้กล่าวรายละเอียดต่อไป

การเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาผล และกลไกการออกฤทธิ์ของเงลาตินไฮโดรเจล ต่อ angiogenesis

นำหนูทดลองมาสลบด้วย Sodium pentobarbital ปริมาณ 15 มิลลิกรัม / กิโลกรัม น้ำหนักตัว ฉีดเข้าช่องท้อง นำ chamber ที่ประกบอยู่กับผิวหนังออก แล้วทำการ canulate หลอดเลือดดำ (jugular vein) เพื่อเป็นช่องทางให้ยาสลบเพิ่มในระหว่างการทดลอง

การศึกษา angiogenesis จะศึกษาที่บริเวณผิวหนังด้านในที่ประกบกับตัว chamber จากนั้นจัดให้หนูทดลองไม่ตื่นนอนในท่าตะแคงเพื่อนำผิวหนังมาแผ่ให้ตึงบนแผ่น parafin

การศึกษาหาปริมาณและการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดที่เกิดจากเซลล์เฮปจี-ทู โดยวิธี Intravital Fluorescence videomicroscopy

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ทำการฉีด FITC-dextran-250 ปริมาณ 5 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตรของสารละลาย เข้าทางหลอดเลือดดำข้างลำคอที่ canulate ไว้ สารเรืองแสงนี้จะอยู่ในพลาสมา (plasma) ทำให้เห็นหลอดเลือดชัดเจนผ่านทางกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และถ่ายทอดขึ้นจอโทรทัศน์ และบันทึกในวิดีโอเทป โดยกล้องถ่ายวิดีโอชนิด SIT (Hamamatsu Co.) แบบ real time โดยมี video timer หลังจากเสร็จการทดลองจึงนำวิดีโอของแต่ละการทดลองวิเคราะห์หาการเกิดหลอดเลือดใหม่โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Gobar Lab II (Datatranslation Co.)

หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อบริเวณที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทูไปตัดทำการศึกษาโดยวิธี H&E แล้วนำมาอ่านผลเพื่อศึกษาขนาดของเซลล์มะเร็ง

การเตรียมแผ่นเคอร์คูมินไฮโดรเจล

เมื่อได้สารละลาย cholesterol grafted gelatin (3% wt/wt) มาหล่อแบบด้วย Teflon molds แล้วทิ้งให้เย็นที่ -30°C แล้วจึงนำมาทำปฏิกิริยา Crosslink กับ glutaraldehyde in acetone:water (75:25) mixture for 24 hours at 4°C [2-3]. สาร glutaraldehyde ที่มากเกินไปจะถูกกำจัดออกโดย 0.1M glycine solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และ สาร glutaraldehyde ที่มากเกินไปจะถูกล้างออกโดย de-mineralized water ได้เป็นที่ต้องนำไป freeze dried เป็นเวลา 2-3 วันแล้วเก็บรักษาไว้ในที่แห้งสนิท

Curcuminoid จะถูกละลายด้วย ethyl alcohol หรือ Sodium hydroxide หรือ DMSO ที่ความเข้มข้นต่างๆ และถูกดูดซับเป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ลงบนแผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บไว้ในภาชนะปลอดเชื้อก่อนการใช้งาน แผ่นเจลลาตินดัดแปลงที่ดูดซับ curcuminoid จะถูกแช่ในสารละลาย biological buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการเก็บตัวอย่างสารละลายที่เวลาต่างๆ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของ curcuminoid ที่ถูกปลดปล่อยออกมา โดยกระบวนการแพร่ (diffusion) จนกระทั่งไม่มีการแพร่ออกมาอีก แล้วแผ่นเจลลาตินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) จนละลายทั้งหมด และมีการวิเคราะห์ปริมาณ curcuminoid ทั้งหมดที่ถูกตรึงบนแผ่นเจลลาตินด้วย hydrophobic interaction การวิเคราะห์ปริมาณ curcuminoid ทำโดยวิธี spectrophotometry และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Health et. al 2003, Cayman Chemicals, 1998)

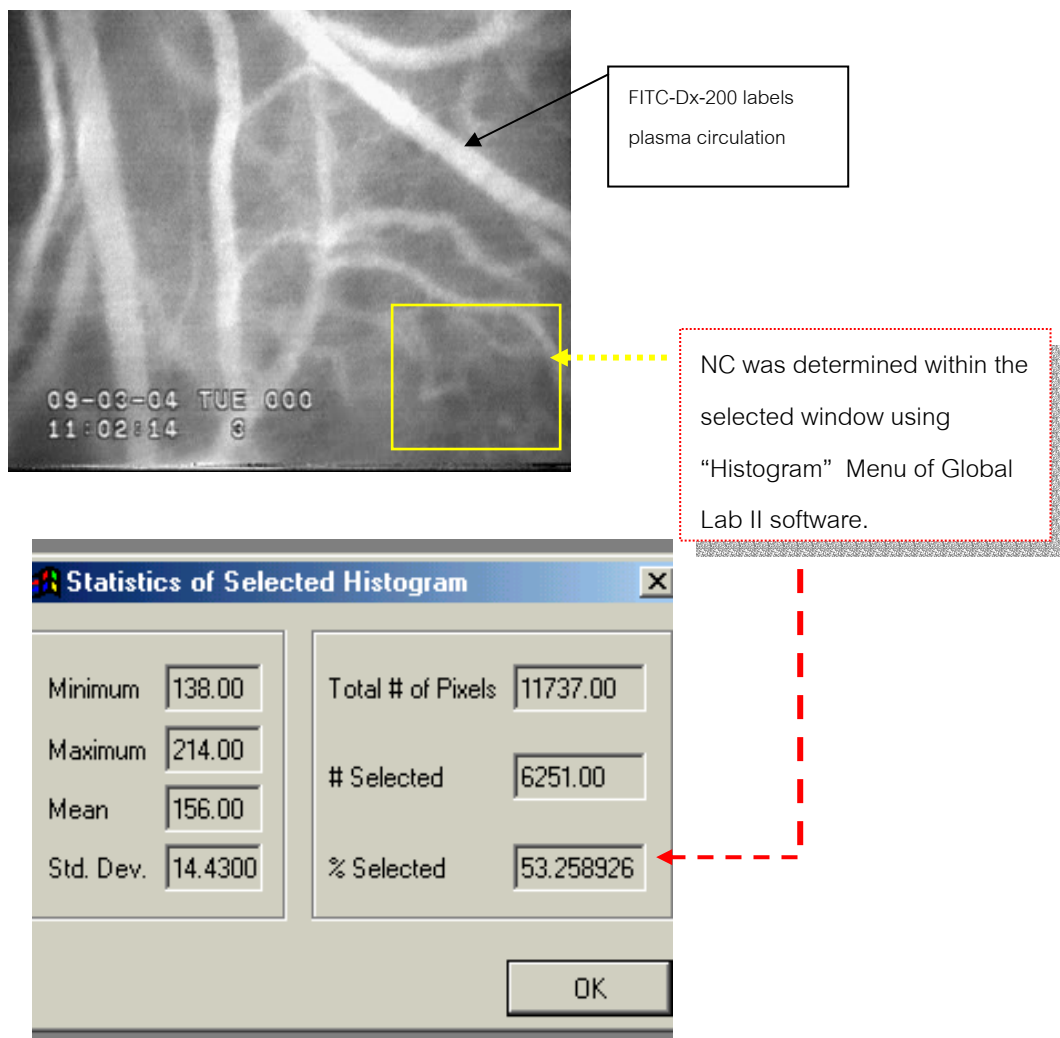
การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของหลอดเลือดในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็ง (Neocapillary Density)

ณ วันที่ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ Microcirculation RU ความหนาแน่นของหลอดเลือดในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็ง (Neocapillary Density =NC) จะคำนวณโดย Software Image Analysis(ref. 8-9) หลอดเลือดในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็งจะสามารถมองเห็นได้โดยใช้

สาร Florescein Isothiocyanate labeled Dextran (FITC-Dx-200, MW.=200,000) และจะถูกบันทึกเก็บภาพโดย Real

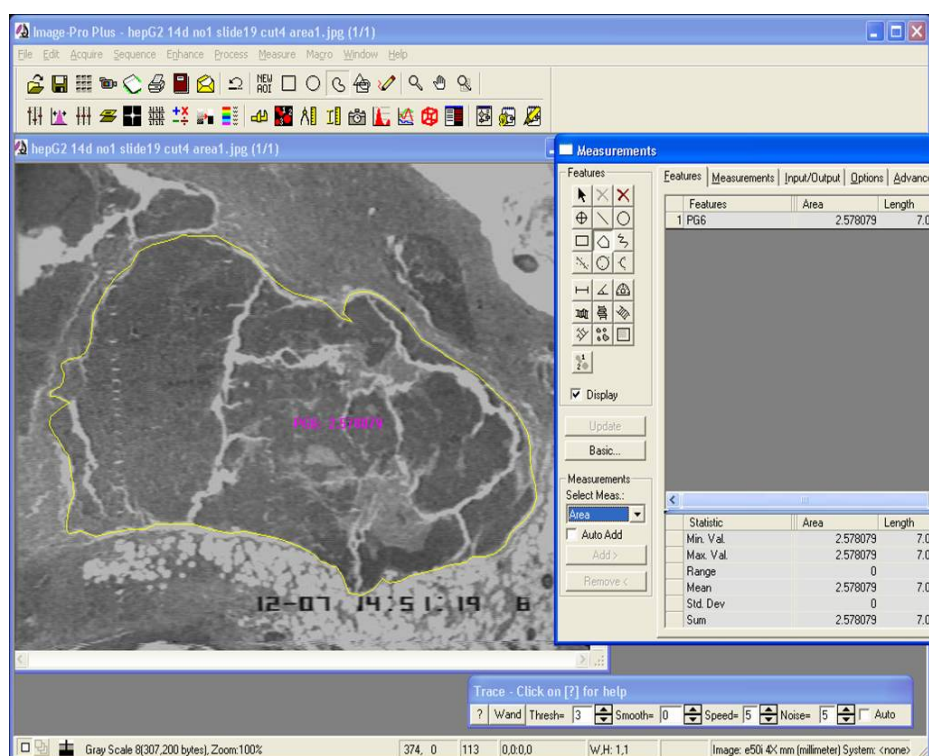
time video camera (Hamamatsu) ตลอดการทดลอง จากภาพที่อัดวิดีโอจะนำมาวิเคราะห์ภายหลัง เพื่อหาความหนาแน่นของหลอดเลือดในบริเวณที่ปลูกเซลล์มะเร็ง (Neocapillary Density =NC) โดยจะสามารถแสดงเป็นร้อยละต่อพื้นที่ที่ทำการศึกษาเท่าๆกัน โดยใช้ Software Digital Image Analysis ของ Datatranslation Global Lab II (USA) (ref. 8-9) (ดังรูป 2)

Determination of Neocapillary Density using Global Lab II Software



การวิเคราะห์ขนาดของมะเร็ง โดยโปรแกรม IMAGE PRO II

ถูกบันทึกเก็บภาพโดย Real time video camera (Hamamatsu) ตลอดการทดลอง จากภาพนำ slide มาอัดวิดีโอจะนำมาวิเคราะห์ภายหลัง เพื่อหาขนาดของมะเร็ง ในบริเวณที่ปลูกโดยจะสามารถแสดงเป็นร้อยละต่อพื้นที่ที่ทำการศึกษากัน โดยใช้ Software Digital Image Analysis ของ IMAGE PRO II (USA) ซึ่งใช้สะดวกกว่า Software Digital Image Analysis ของ Datatranslation Global Lab II (USA) (ดังรูปที่ 3)



การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล เพื่อศึกษาว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบที (t-test) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Minitab system for Windows version 14, USA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P\text{-value} < 0.05$)

ผลการวิจัย

จากผลการทดสอบ in vitro ซึ่งแสดงการปลดปล่อยคอร์คูมินจากแผ่นเจลาคตินดัดแปลงที่เวลาต่างๆ จึงเลือกทดสอบ in vivo โดยใช้ CG 66 (หนัก 10 มิลลิกรัม) ซึ่งดูดซับคอร์คูมินปริมาณ 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น ใช้ปริมาณสารเชื่อมพันธะเป็น 3 เท่าของคอเลสเตรอล

เพื่อให้มีการย่อยสลายภายในระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ แผ่นเจลลาตินดัดแปลงถูกฆ่าเชื้อด้วยการอบเอริลีนออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วนำไปดูดซับเคอร์คูมิน (ละลายในเอทานอล pH~6) จากนั้นนำไปทำการทดลองหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ แล้วจึงนำมาทำการทดลอง Intravital Fluorescence microscopy เพื่อหาปริมาณ capillaries density ในบริเวณ chamber ที่ปลูกเซลล์มะเร็ง



รูปที่ 1 CG 66 (หนัก 10 มิลลิกรัม) ซึ่งดูดซับเคอร์คูมินปริมาณ 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น ใช้ปริมาณสารเชื่อมพันะเป็น 3 เท่าของคอลเลสเตอรอล เพื่อให้มีการย่อยสลายภายในระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์

หลังจากที่ทำการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทูแล้ว จึงใส่ เคอร์คูมินแพท CG 66 (หนัก 10 มิลลิกรัม) ซึ่งดูดซับเคอร์คูมินปริมาณ 40 มิลลิกรัม/กรัมแผ่น ในบริเวณข้างๆ ส่วนกลางที่ปลูกเซลล์มะเร็งในวันที่ 2 (48 ชม. หลังการปลูก เพราะรายงานการวิจัยแสดงว่าเซลล์มะเร็งในโมเดลนี้สามารถยืนยันโดยพยาธิแพทย์ภายใน 24 ชม.) 14 วันหลังจากนั้นจึงนำมาศึกษาหาปริมาณหลอดเลือดใหม่ โดยวิธี intravital videomicroscopy ดังกล่าวในข้างต้น

ตัวอย่าง video image แสดงว่ากลุ่ม HepG2 จะมีปริมาณของหลอดเลือดใหม่เกิดขึ้นจำนวนมาก



a). Control 14 days

b). HepG2 14 days

c). HepG2-cur-patch 14 days

รูปที่ 2.a-c แสดงตัวอย่างของการเกิดหลอดเลือดใหม่ที่เกิดขึ้นแต่ละกลุ่มในวันที่ 14 หลังการปลูกเซลล์มะเร็ง

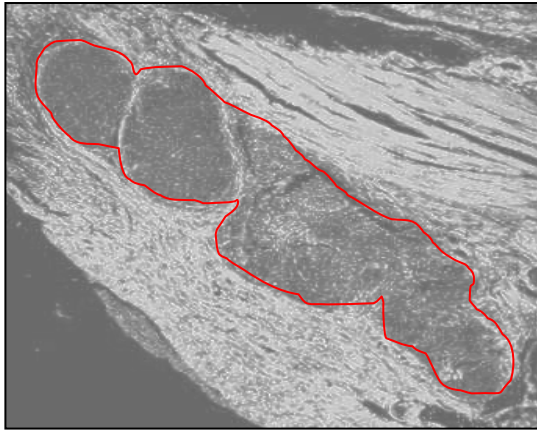
ตารางที่ 1 หลังจากทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Global Lab II และคำนวณหา Percentage of Capillaries Density ดังกล่าวแล้ว สามารถสรุปผลได้คือ

Control gr. (n=6)	HepG2 gr. (n=6)	HepG2-cur-patch (n=5)
32.18±3.37%	68.69±0.9%*	20.73±1.9%**

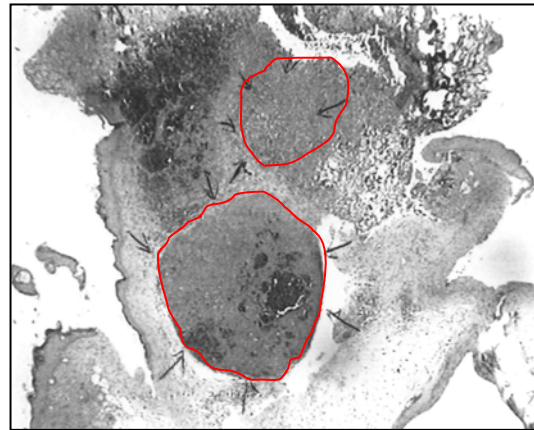
* P < 0.001 compared to control

** P < 0.001 compared to HepG2

หลังการตรวจโดยพยาธิแพทย์ยืนยันผลของการเกิดมะเร็ง จึงนำ slide H&E ของแต่ละกลุ่มที่พบมาวิเคราะห์ เริ่มแรกจะคัดเลือกสไลด์ ที่มีก้อนมะเร็งอยู่ในชั้นกลางๆของก้อนมะเร็งซึ่งจะเป็นพื้นที่ก้อนมะเร็งที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างที่สุด ในการหาพื้นที่ก้อนมะเร็งนั้นจะใช้โปรแกรม Image Pro-Plus 6.1 โดยใช้คำสั่งในการวาดรูปแบบ Polygon เนื่องจากก้อนมะเร็งมีรูปร่างที่ไม่เป็นรูปทรง นอกจากนี้ก้อนมะเร็งยังมีลักษณะติดสี Hematoxylin เข้มมากกว่าส่วนของผิวหนัง จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างก้อนมะเร็งและส่วนของผิวหนังได้ จากนั้นจึงลากเส้นวาดรูปตามขนาดก้อนมะเร็งดังรูป แล้วจึงนำมาวิเคราะห์หาพื้นที่ของก้อนมะเร็งเทียบแต่ละก้อน แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (ดังรูปที่ 3.3)



HepG2 14 days



HepG2-cur-patch 14 days

รูปที่ 3 ภาพแสดงมะเร็งในหนูชนิดไมส์กลุ่ม 14 วัน

ตารางที่ 2 หลังจากทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Global Lab II และคำนวณหา mean of tumor area

Control gr. (n=6)	HepG2 gr. (n=6)	HepG2-cur-patch (n=5)
-	3.025±1.55	0.807±0.092**

** P < 0.001 compared to HepG2

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าเจลาตินไฮโดรเจลที่ควบคุมการปล่อยสารเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดไมส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจี-ทู 14 วันได้ และมีผลทำให้มะเร็งมีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตามที่กล่าวมาแล้วว่าการให้ curcumin ขนาด 3000มก./กก.นน.ตัว ในหนูหนักประมาณ 30กรัม หนูจะได้รับ curcumin ที่ดูดซึมเข้าไปในพลาสมาเพียงประมาณ 0.00027 ug/ml of plasma (www.bioperin.com/BioWithCur.htm) และถ้าหนูได้รับ14วันโดยสมมติว่ามีการขับออกน้อยมาก ดังนั้นรวม curcumin ที่ควรจะมีอยู่ในพลาสมาคือ $14 \times 0.00027 = \underline{0.0038 \text{ ug/ml of plasma}}$

เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณ เคอร์คูมินที่สามารถบรรจุในแพท ที่ใส่ให้หนูหนึ่งตัวและสลายหมดในระยะเวลา 14 วัน จะเท่ากับ 0.01mg หรือเท่ากับ 2.63 เท่าของการดูดซึมจากลำไส้ (0.01/0.038)

จากการศึกษาโดยคณะผู้วิจัย (Yoysungneon *et al.*, 2006) พบว่า curcumin ขนาด 3000 มก./กก.น.น.ตัว สามารถยับยั้ง การเกิดหลอดเลือดใหม่ได้ ประมาณ 26% (14 วัน) แต่จากการใช้เคอร์คูมินแพท พบว่า การเกิดหลอดเลือดใหม่ถูกยับยั้งไปถึง ประมาณ 47 % (14 วัน)

วิจารณ์ผลการทดลอง

โครงการนี้เพื่อศึกษาผลของขมิ้นชันในการเป็นสารต้านการอักเสบ สารต้านการติดเชื้อ ในหนูที่มีการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรและสารต้านมะเร็งในหนูชนิดไมส์ที่ได้รับการปลูกถ่าย เซลล์มะเร็งตับ ประกอบด้วย 3 งานวิจัยย่อยได้แก่

เรื่องที่ 1 ศึกษาผลด้านการอักเสบของ curcumin ในการผลลการรั่วของหลอดเลือดขนาด เล็กในกระเพาะอาหาร การแสดงออกของ NF-KB p65 และระดับของ VEGF ในซีรัมของหนูที่เป็น กระเพาะอาหารอักเสบจากการติดเชื้อ *H. pylori*

เรื่องที่ 2 ศึกษาผลด้านการติดเชื้อของ curcumin ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ใน หลอดทดลอง

เรื่องที่ 3 ศึกษาผลต้านมะเร็งของ curcumin โดยใช้เจลาตินไฮโดรเจลเพื่อควบคุมการ ปล่อยสาร ต่อการยับยั้งการหลอดเลือดใหม่ ในหนูชนิดไมส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งตับ

จากผลการทดลองของทั้ง 3 งานวิจัยช่วยสนับสนุนและยืนยันว่า ขมิ้นชันมีผลในการเป็น สารต้านการอักเสบ สารต้านการติดเชื้อ และสารต้านมะเร็งได้ เป็นการศึกษาวิจัยพื้นฐาน ซึ่งจะ สามารถพัฒนาการใช้สมุนไพรต่อไปได้ในระดับคลินิก

เอกสารอ้างอิง

1. Hergenbahn M, Soto U, Weninger A, Polack A, Hsu CH, Cheng AL, et al. The chemopreventive compound curcumin is an efficient inhibitor of Epstein-Barr virus BZLF1 transcription in Raji DR- LUC cells. *Mol Carcinog.* 2002;33:137-45.
2. Ikezaki S, Nishikawa A, Furukawa F, Kudo K, Nakamura H, Tamura K, et al. Chemopreventive effects of curcumin on glandular stomach carcinogenesis induced

- by N-methyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine and sodium chloride in rats. *Anticancer Res.* 2001;21:3407-11.
3. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (Diferuloylmethane). *J Biol Chem.* 1995;270:24995-5000.
 4. Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, et al. Curcumin blocks cytokine-mediated NF- κ B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I- κ B kinase activity. *J Immunol.* 1999;163:3474-83.
 5. Duvoix A, Morceau F, Delhalle S, Schmitz M, Schnekenburger M, Galteau MM, et al. Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:1475-83.
 6. Foryst-Ludwig A, Neumann M, Schneider-Brachert W, Naumann M. Curcumin blocks NF- κ B and the motogenic response in *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *BBRC.* 2004;316:1065-72.
 7. Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and Ikappa Balpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 2003;101(1053-1062).
 8. Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, Marme D, Salimath BP. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *BBRC.* 2002 297:934-42.
 9. Mobley HLT. *Helicobacter pylori* urease. In: Achtman M, Suerbaum S, editors. *Helicobacter pylori: molecular and cellular biology*. Wymondham: Horizon Scientific Press; 2001. p. 155-70
 10. Gerhard M, Hirno S, Wadstrom T, Ilver D, Arnqvist A, Ogren J. *Helicobacter pylori*, an adherent pain in the stomach. In: Achtman M, Suerbaum S, editors. *Helicobacter pylori: molecular and cellular biology*. Wymondham: Horizon Scientific Press; 2001. p. 185-206.
 11. Montecucco C, Papini E, de Bernard M, Ilver D, Arnqvist A, Ogren J. *Helicobacter pylori* VacA vacuolating cytotoxin and HP-Nap neutrophil activating protein. In: Achtman M, Suerbaum S, editors. *Helicobacter pylori: molecular and cellular biology*. Wymondham: Horizon Scientific Press; 2001. p. 245-63.

12. Szabo I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, et al. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J.* 1999;18:5517-27.
13. Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science.* 2000;287:1497-500.
14. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science.* 2002;295:683-6.
15. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science.* 2003;300:1430-4.
16. Fan X, Gunasena H, Cheng Z, Espejo R, Crowe SE, Ernst PB, et al. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol.* 2000;165:1918-24.
17. Mueller A, Merrell DS, Grimm J, Falkow S. Profiling of microdissected gastric epithelial cells reveals a cell type-specific response to *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology.* 2004;127:1446-62
18. Naumann M, Wessler S, Bartsch C, Wieland B, Covacci A, Hoss R. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island. *J Biol Chem.* 1999;274:31655-62.
19. Keates S, Keates AC, Warny M, Peek RM, Murray PG, Jr, Kelly CP. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag+ and cag- *Helicobacter pylori*. *J Immunol.* 1999;163:5552-9.
20. Yoshida N, Granger DN, Evans DJ, Evans DG, Graham DY, Anderson DC, et al. Mechanism involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology.* 1993;105:1431-40.
21. Innocenti M, Thoreson A-C, Ferrero RL, Stromberg E, Bolin I, Eriksson L, et al. *Helicobacter pylori*-induced activation of human endothelial cells. *Infect Immun.* 2002;70:4581-90.

22. Kubes P, Grisham MB, Barrowman JA, Gaginella T, Granger DN. Leukocyte-induced vascular protein leakage in cat mesentery. *Am J Physiol.* 1991;261:H1872-H9.
23. Korthuis RJ, Carden DL, Kvietys PR, Shepro D, Fuseler J. Phalloidin attenuates postischemic neutrophil infiltration and increased microvascular permeability. *J Appl Physiol.* 1991;71:H1261-H9.
24. Rosengren S, Ley K, Arfors K-E. Dextran sulfate prevents LTB₄-induced permeability increase, but not neutrophil emigration in the hamster cheek pouch. *Microvasc res.* 1989;38:243-54.
25. Kurose I, Granger DN, Evans DJ, JR., Evans DG, Graham DY, Miyasaka M, et al. *Helicobacter pylori*-induced microvascular protein leakage in rats: role of neutrophils, mast cells, and platelets. *Gastroenterology.* 1994;107:70-9
26. Bussolino F, Cammuso G, Aglietta M, Braquet P, Bosia A, Pescarmona G, et al. Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures. *J Immunol.* 1987;139:2439-46.
27. Guatam N, Olofsson AM, Herwald H, Iversen LF, Lundgren-Akerlund E, Hedqvist P, et al. Heparin-binding protein (HBP/CAP37): A missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability in inflammation. *Nature Med.* 2001;7:1123-7.
28. Atuma C, Engstrand L, Holm L. Extracts of *Helicobacter pylori* reduce gastric mucosal blood flow through a Vac A and Cag A – independent pathway in rats. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33:1256-61.
29. Atuma C, Engstrand L, Holm L. *Helicobacter pylori* extracts reduce gastric mucosal blood flow by a nitric oxide-independent but mast cell and platelet activating factor receptor-dependent pathway in rats. *Scand J Gastroenterol.* 1999;34:1183-9.
30. Kim JS, Kim JM, Jung HC, Song IS. *Helicobacter pylori* down-regulates the receptors of vascular endothelial growth factor and angiopoietin in vascular endothelial cells implications in the impairment of gastric ulcer healing. *Dig Dis Sci.* 2004;49(5):778-86.
31. Kalia N, Jones C, Bardhan KD, Reed MWR, Atherton JC, Brown NJ. Effects of genotypically different strains of *Helicobacter pylori* on human microvascular endothelial cells in vitro. *Dig Dis Sci.* 2001;46(1):54-61.

32. Caputo R, Tuccillo C, Manzo BA, Zarrilli R, Tortora G, Blanco CDV, et al. *Helicobacter pylori* VacA Toxin Up-Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression in MKN 28 Gastric Cells through an Epidermal Growth Factor Receptor-, Cyclooxygenase-2- dependent Mechanism. Clin Cancer Res. 2003;9:2015-21.
33. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. J Cell Sci. 1995;108:2369-79
34. Mahady GB, Pendland SL, Yun G, Lu ZZ. Tumeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. Anticancer Res. 2002;22:4179-81.
35. Foryst-Ludwig A, Neumann M, Schneider-Brachert W, Naumanna M. Curcumin blocks NF- κ B and the motogenic response in *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. BBRC. 2004;316:1065-72.
36. Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. Pharmacol Toxicol. 1978;43:86-92.
37. Kelloff, G.J., Hawk. E.T., Karp, J.E., Crowell, J.A., Boone, C.W., Steele, V.E., Lubet, R.A., and Sigman, C.C. (1997). Progress in clinical chemoprevention. *Semin.Oncol.*, 24, 241-252.
38. Huang S, Robinson JB, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of nuclear factor- κ B signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. Cancer Res. 2000;60:5334–9
39. Rao CV, Rivenson A, Simi B, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. Cancer Res. 1995 Jan 15;55(2):259- 66.
40. Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Boone CW, Malone WA, Hawk ET, Lieberman R, Lawrence JA, Kopelovich L, Ali I, Viner JL, Sigman CC. Progress in cancer chemoprevention. Ann N Y Acad Sci. 1999;889:1-13.
41. Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, Howells L. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF- κ B activation via the NIK/IKK

signalling complex. *Oncogene*. 1999 Oct 28;18(44):6013-20.

42. Thong-Ngam D, Prabjone R, Visedopas N, Chatsuwan T. A simple rat model of chronic *Helicobacter pylori* infection for research study. *Thai J Gastroenterol*. 2005;6(1):2-6.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

1. ได้นำเสนอผลงานวิจัยและได้ตีพิมพ์ใน proceeding book ระดับนานาชาติ

1. ได้นำเสนอผลงานเรื่อง Curcumin blocks VEGF synthesis and NF-kappa B activation on prevention of gastric microcirculatory albumin leakage in Helicobacter pylori infected rats เป็น poster presentation ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Digestive Disease Week 2007, May 19-24, New York, USA และได้ตีพิมพ์บทความ Thong-Ngam D, Sintara K, Patumraj S, Klaikeaw N, Chatsuwan T. Curcumin blocks VEGF synthesis and NF-kappa B activation on prevention of gastric microcirculatory albumin leakage in Helicobacter pylori infected rats. GASTROENTEROLOGY 2007;132 (4) Suppl. 2: A219-A219

2. ได้นำเสนอผลงานเรื่อง Antibacterial activity of Aloe vera, curcumin, garlic, and Plau-noi against Helicobacter pylori เป็น oral presentation ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 6th Western Pacific Helicobacter Congress 2006, Nov 12-14, Bangkok, Thailand และได้ตีพิมพ์บทความ Thong-Ngam D, Chatsuwan T. Antibacterial activity of Aloe vera, curcumin, garlic and plaunotol against Helicobacter pylori. HELICOBACTER 2006;11 Suppl.: 44-44

3. ได้นำเสนอผลงานเรื่อง Effects of Controlled Release Curcumin from Gelatin Hydrogel on Tumor-Angiogenesis Using Hep-G2 Implanted BALB/c-nude Mice Model พ.ศ 2550 .การประชุมประจำปีวิศวกรรมชีวการแพทย์แห่งชาติ ครั้งที่ (5) 5nd National Conference on Biomedical Engineering) ณ โรงแรมทวินทาวเวอร์ กรุงเทพฯ สนับสนุนโดย NECTEC จัดโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสาร

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ 1 เรื่อง คือ Thong-Ngam D, Chatsuwan T. Antibacterial activity of Aloe vera, curcumin, garlic, and Plau-noi against Helicobacter pylori. Thai J Gastroenterol 2007; 8:5-10

2. ผลงานรองลงตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ 1 เรื่อง คือ Kawiya Sintara, Duangporn Thong-Ngam, Suthiluk Patumraj, Naruemon Klaikeaw, Tanittha

Chatsuwan.Effects of Curcumin on Gastric Microvascular Leakage, NF-**K**B p65 Expression, and Change in VEGF Level in *Helicobacter pylori*-infected Rats

หมายเหตุ

เนื่องจากคณะผู้วิจัยจะพยายามดำเนินการจดสิทธิบัตรสิ่งประดิษฐ์ เคอร์คูมินแพทช์ นี้ จึงยังไม่สามารถ ตีพิมพ์เผยแพร่ได้

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่

โครงการนี้มีเพื่อต้องการศึกษาว่าไขมันชั้นมีผลในการเป็นสารต้านการอักเสบ สารต้านการติดเชื้อและสารต้านมะเร็งได้ โดยดูผลด้านการอักเสบจากการศึกษาผลของไขมันชั้นต่อการรั่วของโปรตีนในหลอดเลือดขนาดเล็กในกระเพาะอาหาร การแสดงออกของเอ็นเอฟแคป ปาบี-ฟิโทสลิปห่า และการเปลี่ยนแปลงระดับวีสีจีเอฟในหนูที่ติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีพบว่าความสำเร็จต่อการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีถึงร้อยละ 85 และการติดเชื้อนำไปสู่การรั่วของสารโมเลกุลใหญ่ การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟิโทสลิปห่า และระดับวีสีจีเอฟที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยค่าเฉลี่ยการรั่วของสารโมเลกุลใหญ่คือร้อยละ 10.69 ± 1.43 และ 15.41 ± 2.83 ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟิโทสลิปห่าคือร้อยละ 28.58 ± 2.82 และ 44.2 ± 5.24 และ ค่าเฉลี่ยระดับวีสีจีเอฟในหน่วยพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 228.57 ± 40.41 และ 619.43 ± 145.68 เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุม และกลุ่มติดเชื้อตามลำดับ กลุ่มควบคุมที่ได้เคอร์คูมินไม่มีผลต่อตัวแปรที่ศึกษาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบว่าเคอร์คูมินทั้งสองความเข้มข้นมีผลลดการรั่วของสารโมเลกุลใหญ่และการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟิโทสลิปห่า ($p \leq 0.05$) ค่าเฉลี่ยการรั่วของสารโมเลกุลใหญ่คือร้อยละ 12.32 ± 2.13 และ 13.72 ± 2.22 และ ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟิโทสลิปห่าคือร้อยละ 33.99 ± 4.83 และ 37.11 ± 4.34 ในกลุ่มติดเชื้อที่ได้รับการรักษาด้วยเคอร์คูมิน ขนาด 200 และ 600 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมตามลำดับ ในขณะที่เคอร์คูมินไม่มีผลต่อการลดระดับวีสีจีเอฟ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีเพิ่มการรั่วของสารโมเลกุลใหญ่ออกจากหลอดเลือดของกระเพาะอาหาร การแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟิโทสลิปห่า และระดับวีสีจีเอฟ ถึงแม้ว่าเคอร์คูมินทั้งสองความเข้มข้นไม่สามารถลดระดับวีสีจีเอฟได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เคอร์คูมินสามารถลดการรั่วของสารโมเลกุลใหญ่และการแสดงออกของเอ็นเอฟแคปปาบี-ฟิโทสลิปห่าได้ซึ่งแสดงว่าเคอร์คูมินมีคุณสมบัติต่อต้านการอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ไพโลรีในหนูทดลอง **ดูผลด้านการติดเชื้อจากการศึกษาผลของว่านหางจระเข้ ไขมันชั้น กระเทียม และเปิ้ล้าน้อยในการเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร** พบค่าความเข้มข้นน้อยสุดที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อของว่านหางจระเข้ >512 , ไขมันชั้น $=64$, กระเทียม >512 , และเปิ้ล้าน้อย >512 ตามลำดับ ไม่พบค่าอินฮิบิชันโซนในว่านหางจระเข้ กระเทียม และเปิ้ล้าน้อย แต่ไขมันชั้นมีค่าอินฮิบิชันโซน 6.5-8 มิลลิเมตรเมื่อความเข้มข้นไขมันชั้นเป็น 200 และค่าอินฮิบิชันโซน 10-12 มิลลิเมตรเมื่อความ

เข้มข้นขึ้นเป็น 400 ไมโครกรัม ตามลำดับ สรุปว่า ขมิ้นชันมีผลเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการศึกษาต่อไปทางคลินิก ไม่พบการเป็นสารต้านการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไรของวุ้นเพาะเชื้อ กระเทียม และเปปแตสในการทดลองนี้ **ดูผล**

ด้านมะเร็งจากการศึกษา ผลของเจลลาตินไฮโดรเจลที่ควบคุมการปล่อยสารเคอร์คูมินจาก
ต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจีทู พบว่าผลการทดลองกลุ่ม Hep-G2 พบการเกิดหลอดเลือดใหม่ $68.69 \pm 0.9\%$ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม $32.18 \pm 3.37\%$ และเมื่อพบว่าในกลุ่ม Hep-G2-cur มีการเกิดหลอดเลือดใหม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $20.73 \pm 1.9\%$ ($p < 0.01$) ได้ และมีผลทำให้มะเร็งมีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่ม Hep-G2-cur สรุปเจลลาตินไฮโดรเจลที่ควบคุมการปล่อยสารเคอร์คูมินสามารถยับยั้งการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูชนิดเมาส์ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เฮปจีทู 14 วันได้ และมีผลทำให้มะเร็งมีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ